

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 avril 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/035775 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003024

(22) Date de dépôt international :
14 octobre 2003 (14.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/12775 15 octobre 2002 (15.10.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
FRANCE HYBRIDES [FR/FR]; Domaine du Grand
Puits, F-45110 Chateaufort sur Loire (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ETSURO,
Ono [JP/JP]; Fukui 4-15-7, Nishi-ku, Sapporo 063-0012
(JP). TOSHIMITSU, Ueda [JP/JP]; Shin-ei 5-3-8-2, Kiy-
ota-ku, Sapporo 004-0835 (JP).

(74) Mandataire : CABINET HERRBURGER; 115, boule-
vard Haussmann, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING A MAMMAL PROVIDED WITH RESISTANCE TO AN ALPHA-HERPES VIRUS
MEDIATED INFECTION AND MAMMAL OBTAINED BY IMPLEMENTING SAID METHOD AND SAID MAMMAL'S
PROGENY

(54) Titre : PROCEDE POUR PRODUIRE UN MAMMIFERE RENDU RESISTANT A UNE INFECTION PAR UN ALPHA
HERPES VIRUS AINSI QUE MAMMIFERE OBTENU PAR LA MISE EN ŒUVRE DE CE PROCEDE ET DESCENDANT D'UN
TEL MAMMIFERE

(57) Abstract: The invention concerns a method for producing a mammal belonging to a non-human species made resistant by ger-
minal transgenesis to an alpha-herpes virus mediated infection, for which the HveC or nectin-1 polypeptide constitutes a functional
receptor. The method consists in introducing by insertion or homologous recombination into the genome of the cells constituting the
mammal's germinal line, a transgene enabling expression of a chimeric protein consisting of an extracellular domain of nectin-1 or
HveC or one of its parts and an immunoglobulin crystallizable fragment, in a suitable expression system.

(57) Abrégé : Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale
à une infection par un alpha herpès virus, pour lequel le polypeptide HveC ou nectin-1 constitue un récepteur fonctionnel. L'on
introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère, un
transgène permettant l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC
ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.

WO 2004/035775 A2

« Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus ainsi que mammifère obtenu par la mise en œuvre de ce procédé et descendant d'un tel mammifère »

On connaît différents virus de type herpès qui se distinguent par leur génome ainsi que par leurs caractéristiques biologiques.

Une sous famille de ces virus correspond aux alpha herpès virus parmi lesquels on peut nommer les virus herpès simplex humain de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2), le virus de la maladie d'Aujeszky ou Pseudorabies virus (PRV) et l'herpès virus bovin de type 1 (BHV-1).

Tous ces virus présentent la particularité d'être neurotropes et d'avoir un cycle de réplication très bref et un large spectre d'hôte.

L'infection par ces virus provoque des lésions de l'épiderme, se situant en règle générale au niveau des muqueuses, suivies d'une propagation du virus au système nerveux pouvant y entraîner des inflammations aiguës, ainsi que des infections latentes.

Parmi les alpha herpès virus entraînant les ravages les plus importants, on peut citer le virus PRV qui est un agent pathogène d'une importance économique majeure en production porcine tant par le coût direct des pathologies induites que par celui des moyens de lutte mis en œuvre.

Ce virus est largement présent dans la plupart des régions de forte production porcine (Europe, Amérique du Nord, Asie).

Il existe actuellement plusieurs vaccins contre le virus PRV qui représentent un marché important à l'échelle mondiale.

Une telle vaccination n'est cependant pas sans inconvénients compte tenu en particulier du coût entraîné par la nécessité de vacciner une large proportion des animaux d'un troupeau et les problèmes pratiques liés à cette nécessité qui rendent cette opération particulièrement incommode, ce d'autant plus qu'il est en général nécessaire de faire plusieurs injections.

Le coût et les contraintes de cette opération peuvent en limiter l'usage et par là même également l'efficacité.

Des stratégies d'éradication du virus sont également utilisées avec des résultats variables mais toujours fragiles.

Le virus BHV-1 responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine provoque lui aussi des ravages très importants dans les élevages.

Ce virus est en effet très contagieux tant chez les veaux nouveaux nés que chez les animaux plus âgés ; il peut provoquer une in-

flammation au niveau de la cavité nasale, du larynx, des lésions oculaires et des affections respiratoires, mais également se localiser au niveau du cerveau en provoquant des encéphalites ou encore prendre des formes génitales.

5 Ces différentes affections qui sont fréquemment fatales chez le veau nouveau né entraînent des pertes très importantes pour les éleveurs ; de plus, chez les vaches laitières, on peut observer une chute dramatique de la production de lait.

10 Il existe également plusieurs vaccins contre le virus BHV-1, mais la vaccination présente les mêmes inconvénients que la vaccination contre le virus PRV dans les élevages porcins.

De plus des vaccins contre le virus BHV-1 injectés par voie intra musculaire ont été considérés comme responsables d'avortements chez les vaches gestantes.

15 L'éradication du virus a également été proposée notamment dans certains pays européens, mais elle se révèle particulièrement difficile en raison du caractère latent du virus qui peut demeurer longtemps inactif au sein d'un organisme avant de se manifester, notamment sous l'effet d'un stress.

20 Par suite, la conception d'un procédé permettant d'engendrer des lignées de porcs transgéniques constitutivement résistants au virus PRV ou encore des lignées de bovins transgéniques constitutivement résistants au virus BHV-1 aurait un intérêt économique considérable.

25 L'invention a pour objet de proposer un tel procédé.

Celui-ci a pu être conçu grâce à des recherches préalables effectuées sur un modèle souris, qui tout comme le porc ou le bovin est sensible à certains alpha herpès virus et en particulier aux virus HSV1 et PRV.

30 Il est connu que les alpha herpès virus se lient aux cellules d'abord grâce à l'interaction d'une glycoprotéine virale gC, entrant dans la constitution de la membrane du virion et de l'héparane sulfate présent à la surface des cellules, alors que la fusion ultérieure entre l'enveloppe du virion et la membrane cellulaire fait, quant à elle, intervenir d'autres glycoprotéines (gB, gD, gH et gL).

35 De nombreux travaux ont porté sur l'étude de récepteurs potentiels des alpha herpès virus présents à la surface des cellules de

mammifères hôtes ayant une capacité de fixation de la particule virale et pouvant éventuellement neutraliser ainsi son pouvoir infectieux.

Quatre protéines récepteurs des alpha herpès virus ont été identifiées à ce jour à savoir :

- 5 - le HVEM ou HveA qui est un médiateur d'entrée des virus HVS1 et HVS2 mais pas du virus PRV (Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87, 427-436).
- 10 - trois membres de la superfamille des immunoglobulines (HveB ou nectin-2 ; HveC ou nectin-1 et HveD)

(Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G. (1998). The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attribute of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* 72, 9992-10002 ;

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., Cohen G. H., and Spear, P. G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280, 1618-1620 ;

Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfate heparan sulfate in herpes simplex virus entry. *Cell* 99, 13-22 ;

25 Warner, M. S., Martinez, W., Geraghty, R. J., Montgomery, R. I., Witbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by herpes simplex virus type 2, mutants of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus. *Virology* 246, 179-189.

30 Selon les publications Spear, P. G. (1993). Entry of alpha-herpesviruses into cells. *Semin. Virol.* 4, 167-180 ; Campadelli-Fiume, G., Arsenakis, M., Farabegoli, F., and Roizman, B. (1988). Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J. Virol.* 62, 159-167, il a été suggéré que, outre la liaison initiale avec l'héparane sulfate, c'est l'interaction de la glycoprotéine gD de l'alpha herpès virus avec un récepteur présent à la surface de la cellule qui permet l'entrée du virus

sous une forme infectieuse et que dans certains types de cellules, les virus HSV-1, PRV et BHV-1 peuvent utiliser un récepteur commun de la glycoprotéine gD pour entrer dans la cellule.

Il a ainsi été prouvé que la protéine HVEM peut permettre l'entrée des virus HSV1 et HSV2 dans des cellules non permissives, mais pas celle du virus PRV.

En revanche, il a été démontré que la protéine HveC, et notamment celle du porc se comporte comme un récepteur fonctionnel non seulement du virus HSV.1 mais également des alpha herpes virus animaux PRV et BHV-1 (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nelectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* 281, 315-328 ; Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G. (1998). The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attribute of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* 72, 9992-10002 ; Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., Cohen G. H., and Spear, P. G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280, 1618-1620).

Les capacités de liaison à la glycoprotéine virale gD sont plus particulièrement attribuées au domaine V pour HveC et aux deux premiers domaines riches en cystéine (« CRD ») pour HVEM (Structure-Based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HevA (HVEM). Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Wiley DC, Eisenberg RJ, Cohen GH ; *J virol* 2002, Nov 1 ; 76(21) : 10894-10904).

Cependant il a été montré dans la publication Martinez WM, Spear PG, Amino acid substitutions in the V domain of nectin-1 (HveC) that impair entry activity for herpes simplex virus types 1 and 2 but not for Pseudorabies virus or bovine herpesvirus 1, *J Virol.* 2002 Jul ; 76(14) : 7255-62, que les capacités de liaison avec la glyco protéine virale gD de la protéine HveC pouvaient être altérées significativement sans oblitérer les capacités de cette protéine à déclencher la fusion des membranes cellulaires et virales et permettre ainsi l'entrée des virus PRV et BHV-1 dans la cellule sous une forme infectieuse.

Il a également été montré dans la publication Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, Lopez M. the novel receptors that mediate

the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells Rev Med Virol. 2000 Sep-Oct ; 10(5) : 305-19, que la protéine HveC exprimée par la souris peut jouer un rôle de médiateur de l'entrée des alpha herpès virus PRV, BHV-1 et HSV indépendamment d'une interaction détectable avec la glycoprotéine gD.

Il a de surcroît globalement été conclu dans l'étude Geraghty RJ, Fridberg A, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG, use of chimeric nectin-1 (HveC)-related receptors to demonstrate that ability to bind alphaherpesvirus gD is not necessarily sufficient for viral entry, Virology. 2001 Jul 5 ; 285(2) : 366-75, que l'interaction de la protéine HveC avec la glycoprotéine gD n'était pas suffisante pour permettre l'entrée du virus dans la cellule et que les caractéristiques de la protéine HveC responsables de ses propriétés de médiateur de l'entrée des virus HSV, PVR et BHV1 dans les cellules cibles ne pouvaient être réduites à ses capacités de liaison avec la glycoprotéine gD.

Il est en outre à noter que la protéine HveC possède une séquence polypeptidique remarquablement bien conservée entre les espèces de mammifères ; à titre d'exemple, 97 % des acides aminés sont communs entre la protéine HveC exprimée par le porc et la protéine HveC exprimée chez les bovins, ce qui implique une forte identité de structure et de fonction chez ces deux espèces.

Selon la publication INOBE MANABU et al « Functional analysis of HVEM, a member of TNFR family, by using a transgenic mice expressing soluble form of HVEM » (Biosciences information Service, Philadelphia, PA - US - 2001.03.07), on a créé dans un but expérimental, des lignées de souris génétiquement modifiées, en introduisant dans le génome de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire de la protéine HVEM et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG, ce pour étudier l'implication de la protéine HVEM dans la régulation du système immunitaire.

Il a été ainsi confirmé que l'expression d'une forme soluble de HveM, membre de la famille du récepteur du TNFalpha, produit un effet immunosuppresseur.

A partir de ces connaissances préalables, il est proposé conformément à l'invention un procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus pour lequel le polypeptide HveC ou nectin 1 constitue un récepteur fonctionnel, caractérisé

en ce que l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère ou de l'un de ces ancêtres un transgène permettant l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire de la nectin - 1 ou HveC ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, dans un système d'expression approprié.

L'idée à la base de l'invention a donc consisté à utiliser partiellement les capacités de médiateur de la protéine HveC vis-à-vis de l'entrée du virus visé, mais ce d'une façon inoffensive pour la cellule (en isolant son domaine cellulaire ou l'une de ses parties) de façon à inhiber finalement l'entrée de ce virus dans la cellule et à favoriser son élimination, ce par un processus qui reste encore à déterminer.

Le mécanisme d'action de la protéine chimérique exprimée pourrait notamment comprendre, grâce à la capacité de fixation de celle-ci à la fois pour la particule virale et le récepteur cellulaire Fc, une augmentation des capacités de phagocytose et de destruction des virions par les macrophages et cellules dendritiques et une activation des lymphocytes cytotoxiques NK.

Il pourrait également comprendre la formation de récepteurs membranaires des alpha herpès virus, sous la forme de multimères fonctionnellement altérés par incorporation d'une ou plusieurs unités de la protéine chimérique, permettant la fixation des particules virales à la surface de la cellule mais pas leur entrée dans le cytoplasme sous une forme infectieuse.

Selon l'invention, la protéine HveC ou nectin-1 et/ou l'immunoglobuline appartiennent de préférence à l'espèce homologue.

On pourra également n'utiliser qu'une partie de la nectin-1 ou HveC, ou même, le cas échéant des formes mutées de ces parties, sélectionnées pour leur capacité de liaison avec le virus visé.

La première étape du procédé conforme à l'invention correspond donc à la préparation du transgène qui peut être effectuée en mettant en œuvre des méthodes bien connues des spécialistes et abondamment décrites dans la littérature constituant à cloner :

D'une part, soit l'ADN complémentaire de l'ARN transcrit pour le gène du récepteur cellulaire, à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant le gène de ce

récepteur à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc et pour la partie restante de la chaîne polypeptidique du fragment génomique correspondant (« minigène »).

Dans tous les cas, on utilisera seulement la partie correspondant au domaine extracellulaire de ce récepteur, ou dans une autre version du procédé, une sous partie de ce domaine ou même le cas échéant une séquence polypeptidique essentiellement dérivée de ce domaine extracellulaire.

D'autre part, soit l'ADNc complémentaire de l'ARN transcrit pour l'un des gènes de chaîne lourde pour la classe et la sous-classe d'immunoglobuline choisie (par exemple G1), à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant ce gène de chaîne lourde à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc et pour la partie restante de la chaîne polypeptidique du fragment génomique correspondant (« minigène »). La construction réalisée retiendra avantageusement les régions codant pour les domaines Hinge, CH₂ et CH₃ uniquement de la chaîne lourde d'immunoglobuline choisie (fraction cristallisable).

Un exemple d'une telle construction pour l'immunoglobuline humaine G1 est décrit dans la publication CTLA-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. By Peter S. Linsley, William Brady, Mark Urnes, Laura S. Grosmaire, Nitin K. Damle, and Jeffrey A. Ledbetter ; J. Exp. Med. © The Rockefeller University Press ; volume 174, Septembre 1991, 561-569.

Les opérations de clonage seront réalisées à partir des connaissances préalables existantes relatives aux gènes utilisés, à savoir leur séquence, leur localisation chromosomique, ceci si possible dans l'espèce homologue, sinon en se basant sur les séquences connues pour ce gène chez d'autres mammifères.

Ces opérations pourront être réalisées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) précédée d'une étape de transcription reverse pour l'ADN complémentaire ou par la détection au sein de banques d'ADN génomique de l'espèce visée des clones susceptibles de s'hybrider

avec une sonde spécifique ou de produire un amplicon PCR spécifique du gène recherché.

Cette construction sera réalisée de façon à joindre les séquences codant pour le domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC ou l'une de ses parties en 5' des séquences codant pour le fragment cristallisable de la chaîne lourde d'immunoglobuline (terminée par un codon stop) en respectant le cadre de lecture original des deux gènes, et éventuellement la nature et l'efficacité des jonctions introns-extrons s'ils ont été inclus, de façon à assurer, au final, l'expression d'une protéine chimérique constituée pour sa partie amino terminale du polypeptide correspondant au domaine extracellulaire du récepteur cellulaire HveC ou à l'une de ses sous parties et pour sa partie carboxy terminale des domaines Hinge, CH2 et CH3 de la chaîne lourde d'immunoglobuline.

Cette construction sera réalisée dans un vecteur d'expression permettant une expression forte de la protéine chimérique dans un ou plusieurs compartiments biologiques de l'hôte où elle permettra la protection des cellules de manière à rendre l'hôte globalement résistant à l'infection initiale ou à son développement. Le procédé consistera notamment à utiliser des systèmes d'expression actifs soit de façon constitutive dans l'ensemble des cellules soit plus spécifiquement dans des tissus cibles de l'infection virale tels les tissus du système nerveux central ou les tissus épithéliaux (notamment ceux du système respiratoire).

Le vecteur d'expression pourra comprendre une région promotrice, un signal de terminaison, des éléments stimulateurs de la transcription, des séquences isolatrices du contexte chromatinien, d'autres unités de transcription, tous éléments susceptibles d'assurer l'expression souhaitée.

Le procédé consistera avantageusement en l'emploi de systèmes d'expression constitués à partir de séquences régulatrices clonées chez l'espèce homologue, ou pour l'application à des animaux de rente, chez d'autres animaux d'élevage habituellement consommés par l'homme.

La seconde étape du procédé conforme à l'invention consiste à introduire le transgène ainsi obtenu dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère hôte visé par insertion ou recombinaison homologue, là encore par une méthode bien connue des spécialistes de sorte que ce transgène s'intègre dans le patrimoine génétique de ce mammifère.

On pourra notamment utiliser à cette fin la micro injection pronucléaire du segment d'ADN encodant le transgène ou le transfert nucléaire de cellules transformées en culture par le transgène.

L'invention concerne également un mammifère appartenant
5 à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus pour lequel le polypeptide HveC ou nectin-1 constitue un récepteur fonctionnel par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC ou de l'une de ses parties de préférence de
10 l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma de préférence de l'espèce homologue.

L'invention concerne également le descendant d'un tel mammifère, ayant hérité par descendance du transgène inséré dans le gé-
15 nome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

Selon l'invention, l'alpha herpès virus peut avantageusement être le virus PRV et le mammifère appartenir à l'espèce porcine.

Selon une variante de l'invention l'alpha herpès virus peut également être le virus BHV-1 et le mammifère appartenir à l'espèce bo-
20 vine.

Il est essentiel conformément à l'invention que l'opération de transgénèse soit une transgénèse germinale de façon que les descendants du mammifère soient eux aussi susceptibles d'exprimer la protéine chimérique.

L'invention se rapporte également à un matériel génétique
25 tel que des semences ou des ovocytes ou des embryons essentiellement dérivés de mammifères transgéniques du type susmentionné.

Plusieurs exemples de séquences de protéines chimériques conformes à l'invention sont jointes en annexe.

30 Il s'agit de séquences en acides aminés qui comprennent le peptide signal à l'extrémité amino terminale qui sera traité lors de la maturation.

Une protéine chimérique conforme à ce modèle est également décrite dans le document JP-2001-328430 dans le cadre d'une autre
35 application.

La faisabilité du procédé conforme à l'invention a été confirmée par

1) des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus herpes simplex humain de type 1 (HSV-1) de souris transgéniques exprimant une protéine chimérique Hvem - Ig.

5 Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur murin HVEM de ce virus et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 humaine.

10 Le domaine extracellulaire murin HveM a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de rate stimulées par la concavaline A, obtenues sur des souris de souche BALB/c.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3'.

15 L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. Human Gene Therapy 9, 1739-1745).

20 Le fragment XhoI/XbaI contenant l'ADN encodant la protéine chimérique HveMIg a été isolé de cette construction et inséré à son tour, après mise en bouts francs des extrémités, dans le site de restriction SmaI du vecteur cosmidique pAxCawt (distribué commercialement par la société TAKARA, Kyoto, Japon) sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β actin) connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-200).

25 On a créé ensuite par micro injection du fragment PmeI/SalI de ce vecteur, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés de souris (génotype F1 C57 BL/6 X SJL) trois lignées A, B, C de souris trans-

géniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique HVEM Ig.

La présence de la protéine HVEM Ig a été détectée comme bande spécifique révélée par un anticorps anti-HVEM Ig (produit par hyperimmunisation sur lapin) par immunoélectrophorèse dans le sérum des 5 trois lignées de souris transgéniques, avec un titre en moyenne plus faible pour les souris de la lignée B.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 1.

10 La concentration en protéine chimérique HVEM Ig du sérum des souris des trois lignées transgéniques A B C est représentée sur les tableaux 1, 2, 3 et 4 joints en annexe.

Les souris transgéniques de trois lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de 15 ces souris et ceux de leurs homologues non transgéniques de la même portée.

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEM Ig étaient effectivement protégées contre le virus HSV-1, on a inoculé par voie intraveineuse et une dose de 10^9 ufc 20 correspondant à dix fois la dose létale (10 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

La DL 50 a été déterminée initialement chez la lignée de souris la moins sensible des deux ayant servi à la production des animaux 25 transgéniques hybrides.

Selon les figures 2, 3, et 4 on a dénombré les souris transgéniques T_g respectivement des lignées A B et C et les souris non transgéniques non T_g demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

On a ainsi pu constater que toutes les lignées de souris 30 transgéniques étaient résistantes au virus HSV-1.

Plus précisément toutes les souris transgéniques des lignées A et C ont survécu à l'inoculation par le virus et sont restées en bonne santé pendant plusieurs mois après l'essai (tableaux 1 et 4).

Seule une souris transgénique de la lignée B, est décédée 35 après l'inoculation par le virus tandis que les six autres ont survécu (tableau 3), mais la lignée B est celle pour laquelle les taux sériques mesurés en HVEM Ig étaient les plus faibles.

En revanche, six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée A, 13 des 14 souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée B et six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée C ont développé des symptômes tels qu'une paralysie ou sont mortes dans les 14 jours qui ont suivi l'inoculation par le virus HSV-1.

On a recherché l'expression du LAT du virus HSV-1 dans les ganglions trigéminaux des souris survivantes après l'inoculation par la méthode décrite dans les publications.

- Spivak, J. G., and Fraser, N. W. (1987). Detection of herpes virus type 1 transcripts during latent infections in mice. J. Virol., 61, 3841-3847.
- Stevens, J. G., and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. Science 173, 843-845.

On a ainsi mis en œuvre la méthode de RT-PCR de façon à détecter l'expression du LAT.

Celle-ci a été observée chez les souris non transgéniques ayant développé des symptômes et chez une seule souris transgénique de la lignée B n'ayant pas présenté de symptômes, mais n'a en revanche pas été observée chez toutes les autres souris transgéniques testées ni chez les souris non transgéniques survivantes n'ayant pas développé de symptômes.

Dans le cadre de cette étude on a également effectué un essai de contrôle dans le but de déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMlg étaient protégées contre le virus PRV ce alors que la protéine HVEM n'est pas un récepteur fonctionnel pour le virus PRV.

A cet effet, on a inoculé par voie intraveineuse et par une dose correspondant à 10 fois la dose létale (10 LD 50) de virus PRV, des souris transgéniques de la lignée A et des souris non transgéniques de la même portée (tableau 2 et figure 5).

On a ainsi pu constater qu'à l'exception d'une souris transgénique qui a survécu pendant 10 jours toutes les souris sont décédées dans les cinq jours suivant l'inoculation par le virus PRV.

Par suite les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMlg ne se sont pas révélées protégées contre le virus PRV.

Dans le cadre de cette étude, on a également cherché à déterminer si la résistance des souris transgéniques à l'inoculation par le

virus HSV-1 ayant pu être constatée *in vivo* s'accompagnait en parallèle d'une résistance des cellules de ces souris une fois isolées.

A cet effet on a inoculé des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus HSV-1.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 5 jours après l'inoculation, et constaté que le nombre de ces plages était nettement plus important dans le cas des fibroblastes de souris non transgéniques que dans le cas de fibroblastes de souris transgéniques (en moyenne 22 plaques par disque de culture pour les souris non transgéniques et 1 plaque par disque de culture pour les souris transgéniques).

On a parallèlement effectué un test similaire pour le virus PRV en inoculant des cultures de fibroblastes embryonnaires issus de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus PRV, sans constater de différences notables entre le nombre de plages de lyse observé chez les souris transgéniques et chez les souris non transgéniques.

Ces résultats sont de nature à prouver que la protéine chimérique HVEMIg exprimée par les fibroblastes des souris transgéniques intervient dans l'inhibition de l'adsorption du virus HSV-1 par ces fibroblastes embryonnaires.

Dans un test complémentaire dont les résultats sont illustrés sur le tableau 5 on a recherché si la protéine chimérique HVEMIg présente dans le sérum de souris transgéniques pouvait inhiber l'infection de cultures cellulaires par les virus HSV-1 ou PRV.

Dans ce but, on a recueilli du sérum de souris transgéniques de la lignée C et incubé avec un inoculat de ce sérum le virus HSV-1 ou le virus PRV avant de le mettre en contact avec des cultures de cellules Vero.

On a ainsi pu établir que le sérum de souris transgéniques de la lignée C peut protéger des cellules Vero d'une contamination par le virus HSV-1 mais pas d'une contamination par le virus PRV.

Un test de contrôle effectué avec du sérum de souris non transgéniques n'a au contraire pas permis de constater d'activité antivirale.

On a par ailleurs constaté que le sérum des souris transgéniques de la lignée C ne présente plus d'activité antivirale après qu'il ait

été mis en contact avec un sérum polyclonal anti-HVEMlg produit par hyperimmunisation sur lapin pendant 30 minutes à température ambiante.

Ce dernier résultat confirme que les capacités séroneutralisantes du sérum des souris transgéniques sont à attribuer à l'expression de la protéine chimérique.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité antivirale constatée provient de la protéine chimérique HVEMlg présente dans le sérum des souris transgéniques, mais sont également sans doute associés à l'expression de cette protéine chimérique à la surface des cellules de l'hôte telles les fibroblastes embryonnaires évalués dans ces tests.

Ces résultats confirment l'efficacité antivirale de l'expression in-vivo d'une forme modifiée d'un récepteur membranaire des alphaherpesvirus, ceci en dépit des propriétés immunosuppressives décrites dans le cas de la protéine HveM.

2) des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus PRV de souris transgéniques exprimant une protéine chimérique Hvec-Ig.

Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur porcin HveC du virus PRV et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 humaine.

Le domaine extracellulaire porcin HveC a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de porc.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3', comme il est décrit et en suivant les conditions proposées dans la publication (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nelectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* 281, 315-32.).

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Human Gene Therapy* 9,

1739-1745). Le fragment XbaI/XbaI de ce plasmide contenant l'ADN encodant la fusion HveC-Ig a été isolé, mis à bouts francs et lié à des adaptateurs Sall, ceci afin de l'insérer à son tour, après digestion par XhoI et Sall, dans le site de restriction XhoI du vecteur pCXN2 sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β actin) connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-200). Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été désigné Pcxn2/pHvecIg.

On a créé par micro injection du fragment Sall/Sall de ce plasmide, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés de souris (souche C57/BL6) six lignées #6, #22, #32, #33, #37, #45 de souris transgéniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique HveC-Ig.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 6.

Les souris transgéniques des six lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de ces souris transgéniques et le poids des souris non transgéniques issues des mêmes portées.

Epreuves virales par injections intra-péritonéales

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HveC-Ig étaient effectivement protégées contre le virus PRV, on a inoculé dans une première série d'épreuve par voie intrapéritonéale une dose de 500 u.f.p. correspondant à vingt fois la dose létale (20 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

Selon le tableau 6 on a dénombré les souris transgéniques T_g respectivement des lignées #6, #22, #32, #33, #37, #45 et les souris non transgéniques non T_g demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

On a ainsi pu constater que les 6 lignées de souris transgéniques étaient résistantes au virus PRV dans cette épreuve réputée sévère, avec 100% de survie des animaux transgéniques, à l'exception d'un seul animal pour la lignée #33.

En revanche, seules environ 9% des souris non transgéniques ont survécu, avec une variation selon les épreuves conduites pour chaque lignée.

Ces épreuves ont été confirmées pour les lignées #22 et #32 dans une laboratoire indépendant en utilisant une souche différente de virus PRV.

Epreuves virales par infection intranasale

On a inoculé dans une deuxième série d'épreuve par voie intranasale une dose de 250 u.f.p. correspondant à dix fois la dose létale (20 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

Selon le tableau 7 on a dénombré les souris transgéniques T_g respectivement des lignées #6, #22, #32, #33, #37 et les souris non transgéniques non T_g demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

On a ainsi pu constater que les 5 lignées de souris transgéniques étaient relativement résistantes au virus PRV dans cette épreuve réputée sévère, avec environ 70 % de survie des animaux transgéniques.

En revanche, seules environ 10 % des souris non transgéniques ont survécu, avec une variation selon les épreuves conduites pour chaque lignée.

Ces résultats démontrent une action protectrice efficace du transgène permettant l'expression de la protéine chimérique HveC-Ig dans le contexte d'une épreuve sévère chez la souris par voie intra nasale.

Globalement, l'ensemble de ces résultats montre l'efficacité in-vivo de la protection conférée à un mammifère par le procédé conforme à l'invention, basé sur l'inhibition de l'entrée d'un alphaherpesvirus dans la cellule cible. Cette efficacité n'est possible que parce que le procédé proposé permet probablement plusieurs niveaux d'action, dont les mécanismes ne sont pas tous entièrement élucidés : au delà des capacités de ligand des protéines virales gD connues pour les récepteurs HveM, HveC, l'utilisation du domaine extracellulaire seul permet d'isoler ses capacités de récepteur des fonctions biologiques complexes de ces protéines transmembranaires dans leur entrée et notamment de leur aptitude à initier des cascades de signalisation intracellulaires.

Ceci permet a priori d'envisager la surexpression de ce domaine protéique sans pour autant en amplifier la fonction physiologique et

permet sans doute l'absence d'effets secondaires observés pour les animaux transgéniques exprimant la protéine chimérique.

Ceci permet probablement dans le contexte d'une infection in vivo :

- 5 - une compétition pour la fixation des particules virales infectantes des protéines chimériques en solution ou présentes à la surface des cellules avec les récepteurs membranaires fonctionnels du virus ;
- la neutralisation des particules virales par opsonisation et augmentation de la phagocytose par les macrophages et cellules dendridiques ;
- 10 - l'activation de l'immunité cellulaire par stimulation des lymphocytes NK.

L'efficacité du procédé dans le cas des infections expérimentales par voie intra nasale ainsi que (pour HveMIg) la résistance des fibroblastes embryonnaires issus d'animaux transgéniques vont dans le sens d'une inhibition efficace de l'entrée du virus dans les cellules cibles sensibles par la fraction membranaire de la protéine chimérique exprimée, au delà de la capacité séroneutralisante de la fraction soluble sécrétée dans le sérum.

Cette inhibition de l'entrée du virus dans la cellule pourrait être le fait de récepteurs membranaires du virus modifiés, selon un mode dominant, autorisant la fixation du virus à la surface des cellules cibles mais pas son entrée dans le cytoplasme sous une forme infectieuse.

L'efficacité du procédé sur l'entrée du virus et les premiers résultats portant sur la latence virale après l'infection (dans le cas d'HveM et HSV1) permettent de surcroît d'envisager l'absence de latence chez les animaux d'élevage ainsi protégés, ce qui n'est pas nécessairement le cas pour les stratégies vaccinales, et donc par là un contrôle plus efficace des phénomènes de résurgence de l'infection.

3) Des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vitro de la résistance au virus BHV-1 et PRV de lignées cellulaires transformées par des plasmides exprimant des protéines chimériques construites à partir du domaine extra cellulaire de la protéine HveC porcine et du fragment cristallisable de l'immunoglobuline Ig humaine.

Selon ce test on a préparé des lignées de cellules Vero transformées par des plasmides exprimant une forme soluble de la protéine HveC porcine inhibant l'entrée des virus BHV-1 et PRV puis on a analysé la résistance de ces lignées cellulaires à l'infection par ces virus

pour déterminer les propriétés antivirales de la forme soluble de la protéine HveC porcine *in vitro*.

Pour construire un plasmide exprimant une forme soluble de la protéine HveC porcine (PHveCIg) on a utilisé un vecteur d'expression PCXN2 permettant la transcription d'un ARN messager codant pour le domaine extra cellulaire de la protéine HveC porcine joint au fragment cristallisable Fc de l'immuno globuline IgG1 humaine.

Le domaine extracellulaire porcin HveC a été cloné par RTPCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de porc.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3' comme il est décrit et en suivant les conditions proposées dans la publication (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* 281, 315-32.).

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. *Human Gene Therapy* 9, 1739-1745). Le fragment XbaI/XbaI de ce plasmide contenant l'ADN encodant la fusion HveC-Ig a été isolé, mis à bouts francs et lié à des adaptateurs Sall, ceci afin de l'insérer à son tour dans le site de restriction XhoI du vecteur pCXN2 sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β actin) connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-200). Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été désigné Pcxn2/pHvecIg.

On a préparé par transfection avec le plasmide ainsi obtenu des lignées cellulaires transformées de manière stable.

Les lignées cellulaires ainsi transformées ont été cultivées dans des conditions permettant l'accumulation de la protéine chimérique dans le milieu à savoir 24 heures de cultures additionnelles après étalement à subconfluence.

Ces cultures ont ensuite été inoculées par les virus PRV ou BHV-1 avec une multiplicité de 50 u.f.p. par boîte de 35 mm de diamètre avec un temps d'incubation d'une heure suivi de deux rinçages au DMEM avant couverture avec du milieu DMEM 0,5 % d'agar.

5 On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 4 jours après l'inoculation. On a constaté que dans les lignées cellulaires exprimant la protéine chimérique PHveCIg le nombre de plaques de lyse a été notablement réduit par comparaison avec des lignées cellulaires résistantes de contrôle et les lignées Vero qua-
10 tre jours après l'inoculation.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 8.

Les lignées cellulaires transformées par le plasmide PCXN2/pHveC Ig sont clairement résistantes à l'affection par les virus PRV et BHV-1.

15 **4) Des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vitro de la résistance aux virus BHV-1 et PRV de lignées cellulaires transformées par des plasmides exprimant des protéines chimériques construites à partir du domaine extracellulaire de la protéine HveC porcine et du fragment cristallisable de**
20 **l'immunoglobuline g1 du porc.**

Selon ce test on a préparé des lignées de cellules Vero transformées par des plasmides exprimant une forme soluble de la protéine HveC porcine inhibant l'entrée des virus BHV-1 et PRV puis on a analysé la résistance de ces lignées cellulaires à l'infection par ces virus
25 pour déterminer les propriétés antivirales de la forme soluble de la protéine HveC porcine in vitro.

Pour construire un plasmide exprimant une forme soluble de la protéine HveC porcine (PHveCIg) on a utilisé un vecteur d'expression pCXN2 permettant la transcription d'un ARN messager codant pour le
30 domaine extracellulaire de la protéine HveC porcine et le fragment cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 porcine.

Le domaine extracellulaire porcin HveC a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de porc.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-
35 TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAG-CAGGTGGTGTCT-3', comme il est décrit et en suivant les conditions proposées dans la publication (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a

member of the highly conserved HveC/necltin 1 family, is a fonctionnal alphaherpesvirus receptor. Virology 281, 315-32.).

L'ADN c ainsi obtenu a été lié en 5' d'un fragment d'ADN c codant pour le fragment cristallisable Fc de l'immunoglobuline Ig porcine en respectant le cadre de lecture original des deux polypeptides.

Le fragment d'ADN c d'immunoglobuline porcine a été cloné à partir d'une préparation d'ARN extraite de tissus lymphoïdes de porc d'une lignée de type Large White (FHO25) par RT PCR en utilisant en tant qu'amorce TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAG-CAGGTGGTGTCT-3' en suivant les conditions proposées dans la publication Simon Musyoka Mwangi, Thomas J. Stabel*, Marcus E. Kehrl Jr, development of a baculovirus expression system for soluble porcine tumor necrosis factor receptor type I and soluble porcine tumor necrosis factor receptor type I-IgG fusion protein, Veterinary Immunology and Immunopathology 86 (2002) 251-254.

L'ADN c résultant de la fusion code pour une protéine chimérique dont la séquence en acides aminés est jointe en annexe (séquence 4).

L'ADN c résultant de la fusion a été inséré dans le site de restriction XhoI du plasmide pCXN2 sous le contrôle du promoteur du gène bêta actin de la poule associé au facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE et la séquence de polyadénylation de la bêta globin de lapin.

Le plasmide résultant ainsi obtenu a été désigné PCXN2/pVCC-pFc.

Une version restreinte de ce plasmide désignée PCXN2/pV-pFc a été construite en utilisant seulement le domaine V de la protéine HveC et le fragment cristallisable Fc de l'immuno-globuline IgG de porc.

La séquence en acides aminés de la protéine chimérique ainsi obtenue est jointe en annexe (séquence 3).

On a préparé par transfection avec le plasmide ainsi obtenu des lignées cellulaires transformées de manière stable.

Les lignées cellulaires ainsi transformées ont été cultivées dans des conditions permettant l'accumulation de la protéine chimérique dans le milieu à savoir 24 heures de cultures additionnelles après étallement à subconfluence.

Ces cultures ont ensuite été inoculées par les virus PRV ou BHV-1 avec une multiplicité de 50 u.f.p. par boîte de 35 mm de diamètre

avec un temps d'incubation d'une heure suivi de deux rinçages au DMEM avant couverture avec du milieu DMEM 0,5 % d'agar.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire trois jours après l'inoculation et effectué
5 les constatations rassemblées dans le tableau 9.

Les lignées cellulaires transformées par les deux versions du transgène exprimant une protéine chimérique conforme à l'invention sont clairement résistantes à l'affection par les virus BHV-1 et PRV.

TABLEAU 1
Résistance des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
I	A1 *	M	14.8	-	
	A2 *	M	10.0	-	
	A3 *	M	11.6	-	
	A4 *	F	7.6	-	
	A5 *	F	8.3	-	
	A6 *	F	10.0	-	
	A7 *	F	24.6	-	
	A8 *	F	8.5	-	
	A9 *	F	7.9	-	
	A10 *	F	7.3	-	
	L1	M	1.5	-	
	L2	M	1.1	-	
	L3	M	1.6	+	4
	L4	M	0.8	+	14
	L5	M	1.6	+	
	L6	F	0.6	+	5
II	A11 *	M	10.1	-	
	A12 *	M	15.9	-	
	A13 *	M	10.5	-	
	A14 *	M	9.3	-	
	A15 *	F	7.3	-	
	A16 *	F	14.0	-	
	A17 *	F	15.4	-	
	A18 *	F	14.9	-	
	L7	M	0.4	+	4
	L8	M	0.5	+	
	L9	F	0.5	+	

TABLEAU 2
Sensibilité des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus PRV

	Numéro de l'animal	Sexe	HVEM Ig (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
	A19 *	M	41.2	+	4
	A20 *	F	19.4	+	10
	A21 *	F	29.6	+	5
	A22 *	F	24.2	+	5
	A23 *	F	20.2	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5

TABLEAU 3
Résistance des souris transgéniques de la lignée B
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
I	B1 *	M	8.5	-		-
	B2 *	M	7.8	-		-
	B3 *	M	7.7	-		-
	B4 *	F	8.1	+	11	
	L1	M	0.4	+	6	
	L2	M	0.7	+	6	
	L3	M	0.5	+	5	
	L4	M	0.7	+	7	
	L5	F	0.3	+	5	
	B5 *	M	5.0	-		+
	B6 *	M	6.2	-		-
	B7 *	F	4.4	-		-
II						
	L6	M	0.6	-		
	L7	M	0.6	+	10	
	L8	M	0.5	+	7	
	L9	M	0.6	+		+
	L10	F	0.4	+	7	
	L11	F	0.5	+	5	
	L12	F	0.5	+	5	
	L13	F	0.5	+	5	
	L14	F	0.4	+	6	

TABLEAU 4
Résistance des souris transgéniques de la lignée C
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
	C1 *	M	20.4	-		-
	C2 *	M	14.2	-		-
	C3 *	F	19.3	-		-
	C4 *	F	18.5	-		-
	C5 *	F	24.3	-		-
	C6 *	F	21.8	-		-
	C7 *	F	24.0	-		-
	C8 *	F	20.6	-		-
	L1	M	1.3	-		-
	L2	M	0.9	+		+
	L3	M	1.6	+	6	
	L4	F	1.3	+	5	
	L5	F	1.4	+	5	
	L6	F	1.5	+	6	
	L7	F	1.6	+	5	

5

Dans les tableaux 1 à 4 les animaux désignés par un * sont des animaux transgéniques alors que les animaux désignés par L sont des animaux non transgéniques de contrôle des mêmes portées.

TABLEAU 5

Neutralisation du virus HVS-1 par la protéine chimérique HVEMlg
dans le sérum de souris transgéniques de la lignée C.
Inoculation de virus HSV1 sur cellules VERO, après incubation avec des
concentrations variables de ce sérum

Serum (HVEMlg ug/ml)	Nombre de plages de lyse observées	
	HSV-1	PRV
(20.4)	0	108.0 ± 8.8
(2.04)	0	-
(0.20)	1.7 ± 1.6	-
(0.02)	34.7 ± 16.2	-
(0.20) + anti HVEMlg	30.3 ± 6.9	-
Contrôle	44.0 ± 0	107.3 ± 2.9

Tableau 6

Epreuves par voie intra péritonéale (20 LD 50).

Lignée	Nombre d'animaux Tg éprouvés	Nombre de contrôles (des mêmes portées) éprouvés	Nombre d'animaux Tg survivant à 14 jours	Nombre de contrôles survivants à 14 jours	% survie animaux transgéniques	% survie des contrôles
PHveCIg#6	5	10	5	2	100	20
PHveCIg#22	12	12	12	0	100	0
PHveCIg#32	10	7	10	1	100	14,2
PHveCIg#33	7	9	6	0	85,7	0
PHveCIg#37	10	4	10	1	100	25
PHveCIg#45	3	12	3	1	100	8,3

Tableau 7
Epreuves par voie intra nasale (10 LD 50).

Lignée	Nombre d'animaux Tg éprouvés	Nombre de contrôles (des mêmes portées) éprouvés	Nombre d'animaux Tg survivant à 14 jours	Nombre de contrôles survivants à 14 jours	% survie animaux transgéniques	% survie des contrôles
PHveCIg#6	8	7	4	0	50	0
PHveCIg#22	23	21	18	2	78,3	9,5
PHveCIg#32	10	8	6	1	60	12,5
PHveCIg#33	17	8	11	1	64,7	12,5
PHveCIg#37	10	7	9	1	90	14,2

5

Tableau 8
Résistance de lignées cellulaires transformées aux alpha herpès virus PRV et BHV-1

Lignée cellulaire *	PHveCIg	Nombre de plages de lyse observé	
		PRV	BHV-1
A6	+	0	0
C1	+	0	0
C2	-	55,8 + 4,6	75,5 + 3,5
Vero	-	50,8 + 6,2	65,0 + 5,6

10

* Dans ce tableau les lignées A6 et C1 sont des lignées cellulaires transformées par le plasmide pCXN2/pHveCIg et exprimant la protéine chimérique PHveCIg alors que la lignée C2 correspond à un témoin négatif de cette transformation n'exprimant pas le transgène et la lignée Vero aux cellules initiales sensibles aux virus et utilisées pour la production des lignées transformées par les différents transgènes.

15

Tableau 9
Résistance de lignées cellulaires transformées aux alpha herpès virus PRV
et BHV-1

Lignée cellulaire *	Nombre de plages de lyse observé	
	PRV	BHV-1
3-16	0	1
V110	0	6
Vero	56	67

* Dans ce tableau la lignée 3-16 est une lignée cellulaire transformée par le plasmide p CXN2 / pVCC - pFc et la lignée V110 est une lignée cellulaire transformée par le plasmide p CXN2 / pV - pFc alors que la lignée Vero correspond aux cellules initiales sensibles aux virus et utilisées pour la production de cellules transformées par les différents transgènes.

REVENDEICATIONS

- 1°) Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus, pour lequel le polypeptide HveC ou nectin-1 constitue un récepteur fonctionnel,
- 5 caractérisé en ce que l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère, un transgène permettant l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part
- 10 du domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.
- 2°) Procédé selon la revendication 1,
- 15 caractérisé en ce que l'immunoglobuline est une immunoglobuline de type gamma.
- 3°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que
- 20 la nectin-1 ou HveC et/ou l'immunoglobuline appartiennent à l'espèce homologue.
- 4°) Mammifère appartenant à une espèce non humaine, caractérisé en ce qu'
- 25 il a été rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus pour lequel le polypeptide HveC ou nectin-1 constitue un récepteur fonctionnel par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC, de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment
- 30 cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, de préférence de l'espèce homologue.
- 5°) Mammifère selon la revendication 4, caractérisé en ce que
- 35 le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est une sous partie du domaine extracellulaire de la nectin-1 ou HveC.
- 6°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 et 5,

caractérisé en ce qu'
il appartient à l'espèce porcine et l'alpha herpès virus est le virus PRV.

- 7°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 et 5,
5 caractérisé en ce qu'
il appartient à l'espèce bovine et l'alpha herpès virus est le virus BHV-1.

- 8°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 7,
caractérisé en ce qu'
10 il renferme dans le génome de ses cellules, un transgène codant pour une
protéine chimérique constituée d'une part du domaine extra cellulaire de
la nectin-1 ou HveC ou de l'une de ses parties, et d'autre part du fragment
cristallisable d'une immuno globuline, dans un système d'expression ap-
proprié, ce transgène ayant été inséré dans le génome de la lignée germi-
15 nale de l'un de ses parents.

- 9°) Matériel génétique tel que semence ou ovocyte ou embryon essentiel-
lement dérivé du mammifère selon l'une quelconque des revendications 4
à 8.

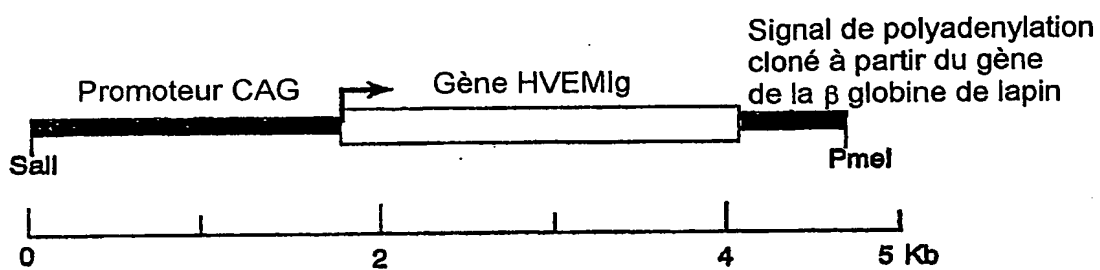


FIGURE 1

FIGURE 2

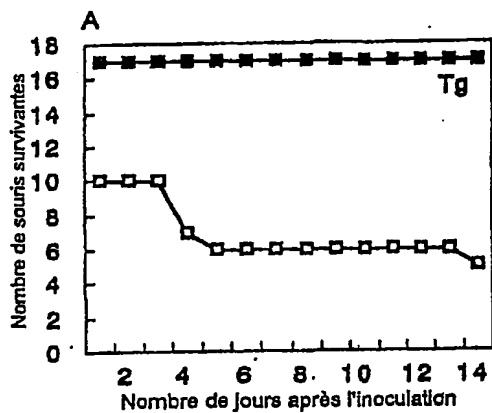


FIGURE 3

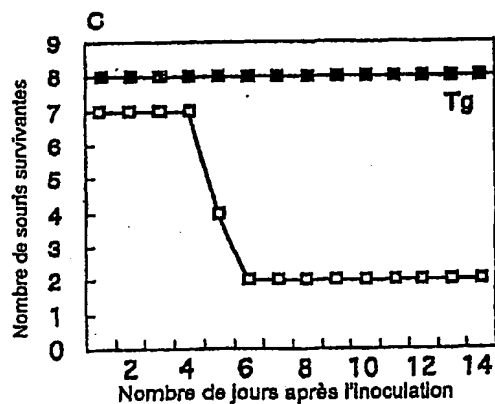
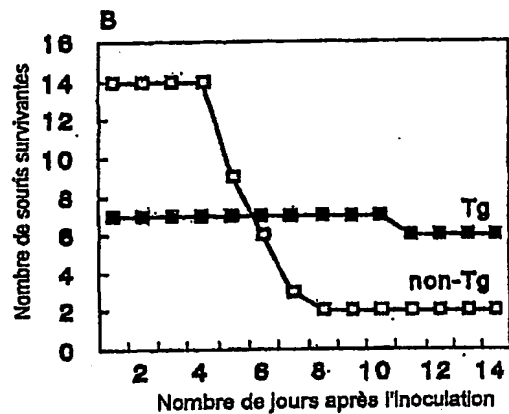


FIGURE 4

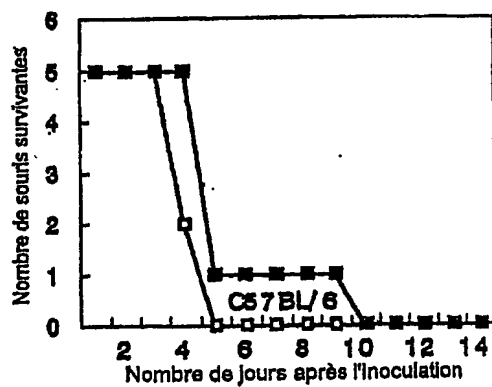


FIGURE 5

FIGURE 6

pVCC HveC - h Fc

CMV IE
Enhancer β actin
promoteur-cDNA
-V-C-C HveC S.Scrofa

Fc-IgG HSA

 β globine
poly A (Lapin)

-pCAGGS

1.1.1. Domaine V de la nectine-1 (HveC) porcine et fragment cristallisable de l'immunoglobuline de porc G1

pV HveC - p Fc

CMV IE
Enhancer β actin
promoteur-cDNA
-V HveC S.Scrofa

Fc-IgG S.Scrofa

 β globine
poly A (Lapin)

-pCAGGS

1.1.2. Domaine extracellulaire de la nectine-1 (HveC) porcine et fragment cristallisable de l'immunoglobuline de porc G1

pVCC HveC - p Fc

CMV IE
Enhancer β actin
promoteur-cDNA
-VCC HveC S.ScrofaFc-IgG
S.Scrofa β globine
poly A (Lapin)

-pCAGGS

hvec.ST25 SEQUENCE LISTING

<110> FRANCE HYBRIDES

<120> Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpes virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé

<130> hvec

<150> Fr02 12775

<151> 2002-10-15

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Protéine artificielle fusionnant le domaine extracellulaire de la protéine HveM de la souris et le fragment cristallisable de d'immunoglobuline G1 humaine

<400> 1

Met Glu Pro Leu Pro Gly Trp Gly Ser Ala Pro Trp Ser Gln Ala Pro
1 5 10 15

Thr Asp Asn Thr Phe Arg Leu Val Pro Cys Val Phe Leu Leu Asn Leu
20 25 30

Leu Gln Arg Ile Ser Ala Gln Pro Ser Cys Arg Gln Glu Glu Phe Leu
35 40 45

Val Gly Asp Glu Cys Cys Pro Met Cys Asn Pro Gly Tyr His Val Lys
50 55 60

Gln Val Cys Ser Glu His Thr Gly Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Pro
65 70 75 80

hvec.ST25

Gln Thr Tyr Thr Ala His Ala Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Pro Cys
 85 90 95
 Gly Val Cys Asp Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Trp Gln Glu Cys Ser
 100 105 110
 Ser Trp Lys Asp Thr Val Cys Arg Cys Ile Pro Gly Tyr Phe Cys Glu
 115 120 125
 Asn Gln Asp Gly Ser His Cys Ser Thr Cys Leu Gln His Thr Thr Cys
 130 135 140
 Pro Pro Gly Gln Arg Val Glu Lys Arg Gly Thr His Asp Gln Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Cys Ala Asp Cys Leu Thr Gly Thr Phe Ser Leu Gly Gly Thr Gln
 165 170 175
 Glu Glu Cys Leu Pro Trp Thr Asn Cys Ser Ala Phe Gln Gln Glu Val
 180 185 190
 Arg Arg Gly Thr Asn Ser Thr Asp Thr Thr Cys Ser Ser Asp Pro Glu
 195 200 205
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 340 345 350

hvec.ST25

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 2

<211> 581

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> Protéine artificielle fusionnant le domaine extracellulaire (domaines V-C-C) de la protéine Hvec du porc et le fragment cristallisable de d'immunoglobuline G1 humaine

<400> 2

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val
 20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
 35 40 45

Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln
 50 55 60

Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
 65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
 85 90 95

Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr hvec.ST25 Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser
 100 105 110
 Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
 115 120 125
 Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala
 130 135 140
 Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Gly Lys Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn
 165 170 175
 Gly Lys Pro Pro Ser Val Val Ser Trp Glu Thr His Leu Lys Gly Glu
 180 185 190
 Ala Glu Tyr Gln Glu Ile Arg Asn Pro Asn Gly Thr Val Thr Val Ile
 195 200 205
 Ser Arg Tyr Arg Leu Val Pro Ser Arg Glu Asp His Arg Gln Ser Leu
 210 215 220
 Ala Cys Ile Val Asn Tyr His Met Asp Arg Phe Arg Glu Ser Leu Thr
 225 230 235 240
 Leu Asn Val Gln Tyr Glu Pro Glu Val Thr Ile Glu Gly Phe Asp Gly
 245 250 255
 Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Met Asp Val Lys Leu Thr Cys Lys Ala Asp
 260 265 270
 Ala Asn Pro Pro Ala Thr Glu Tyr His Trp Thr Thr Leu Asn Gly Ser
 275 280 285
 Leu Pro Lys Gly Val Glu Ala Gln Asn Arg Thr Leu Phe Phe Arg Gly
 290 295 300
 Pro Ile Asn Tyr Ser Met Ala Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Asn
 305 310 315 320
 Pro Ile Gly Thr Arg Ser Gly Gln Val Glu Val Asn Ile Thr Glu Phe
 325 330 335
 Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu His Ala Asp Pro Glu Glu Pro Lys
 340 345 350
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 355 360 365

hvec.ST25
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 370 375 380

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 385 390 395 400

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 405 410 415

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 420 425 430

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 435 440 445

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 450 455 460

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 465 470 475 480

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 485 490 495

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 500 505 510

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 515 520 525

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 530 535 540

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 545 550 555 560

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 565 570 575

Leu Ser Pro Gly Lys
 580

<210> 3

<211> 376

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

hvec.ST25

<223> Protéine artificielle fusionnant le domaine V de la protéine Hvec
du porc et le fragment cristallisable de d'immunoglobuline G1 po
rcine

<400> 3

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15
Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val
20 25 30
Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45
Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln
50 55 60
Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
85 90 95
Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser
100 105 110
Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
115 120 125
Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Gly
130 135 140
Ser Val Gly Ile His Gln Pro Gln Thr Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys
145 150 155 160
Glu Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
165 170 175
Thr Leu Met Ile Ser Gln Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
180 185 190
Val Ser Lys Glu His Ala Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly
195 200 205
Val Glu Val His Thr Ala Glu Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn
210 215 220
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
225 230 235 240
Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Val Asp Leu Pro
245 250 255

hvec.ST25

Ala Pro Ile Thr Arg Thr Ile Ser Lys Ala Ile Gly Gln Ser Arg Glu
260 265 270

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser
275 280 285

Lys Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile
290 295 300

His Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Phe Phe Leu Tyr
325 330 335

Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Arg Trp Asp His Gly Asp Lys Phe
340 345 350

Glu Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
355 360 365

Ser Ile Ser Lys Thr Gln Gly Lys
370 375

<210> 4

<211> 578

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> protéine artificielle fusionnant le domaine extracellulaire (domaines V-C-C) de la protéine Hvec du porc et le fragment cristallisable de d'immunoglobuline G1 porcine

<400> 4

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val
20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45

Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln
50 55 60

Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
 65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
 85 90 95

Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser
 100 105 110

Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
 115 120 125

Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala
 130 135 140

Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Gly Lys Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn
 165 170 175

Gly Lys Pro Pro Ser Val Val Ser Trp Glu Thr His Leu Lys Gly Glu
 180 185 190

Ala Glu Tyr Gln Glu Ile Arg Asn Pro Asn Gly Thr Val Thr Val Ile
 195 200 205

Ser Arg Tyr Arg Leu Val Pro Ser Arg Glu Asp His Arg Gln Ser Leu
 210 215 220

Ala Cys Ile Val Asn Tyr His Met Asp Arg Phe Arg Glu Ser Leu Thr
 225 230 235 240

Leu Asn Val Gln Tyr Glu Pro Glu Val Thr Ile Glu Gly Phe Asp Gly
 245 250 255

Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Met Asp Val Lys Leu Thr Cys Lys Ala Asp
 260 265 270

Ala Asn Pro Pro Ala Thr Glu Tyr His Trp Thr Thr Leu Asn Gly Ser
 275 280 285

Leu Pro Lys Gly Val Glu Ala Gln Asn Arg Thr Leu Phe Phe Arg Gly
 290 295 300

Pro Ile Asn Tyr Ser Met Ala Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Asn
 305 310 315 320

Pro Ile Gly Thr Arg Ser Gly Gln Val Glu Val Asn Ile Thr Glu Phe
 325 330 335

Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu His hvec.ST25 Gly Ser Val Gly Ile His Gln
 340 345 350
 Pro Gln Thr Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys Glu Val Ala Gly Pro Ser
 355 360 365
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Gln
 370 375 380
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Lys Glu His Ala
 385 390 395 400
 Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala
 405 410 415
 Glu Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 420 425 430
 Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe
 435 440 445
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Val Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Thr
 450 455 460
 Ile Ser Lys Ala Ile Gly Gln Ser Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 465 470 475 480
 Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val Thr Leu Thr Cys
 485 490 495
 Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile His Val Glu Trp Lys Ser
 500 505 510
 Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Thr Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln
 515 520 525
 Gln Asp Val Asp Gly Thr Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp
 530 535 540
 Lys Ala Arg Trp Asp His Gly Asp Lys Phe Glu Cys Ala Val Met His
 545 550 555 560
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Gln
 565 570 575
 Gly Lys